

Znaczenie metylacji 2'-O rybozy pierwszego transkrybowanego nukleotydu końca 5' mRNA dla utrzymania wysokiego poziomu translacji kodowanego przez tę mRNA białka. Charakterystyka oddziaływań białko-ligand metodami biofizyki i biologii molekularnej.

Prowadzący:

prof. dr hab. Edward Darżynkiewicz, Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki Doświadczalnej, Wydział Fizyki, Uniwersytet Warszawski (Laboratorium Ekspresji Genu), dziedzina: chemia, specjalność: biologia molekularna

dr hab. Joanna Trylska, Laboratorium Maszyn Biomolekularnych, Centrum Nowych Technologii, Uniwersytet Warszawski, dziedzina: biofizyka i bioinformatyka

In vitro syntetyzowane mRNA (IVT mRNA) stało się obecnie atrakcyjnym celem badań, jako leki nowej generacji dostarczające do komórki informację genetyczną. Punktami słabymi, które wymagają dalszej pracy badawczej jest krótki czas życia oraz immunogenność syntetyzowanego mRNA (Sahin *et al.*, 2014, Vallazza *et al.*, 2015). Na oba te czynniki można wpłynąć wprowadzając różne modyfikacje w obrębie struktury transkryptu. Szczególnie interesującym miejscem do modyfikacji jest struktura kapu znajdująca się na końcu 5' mRNA, która zabezpiecza łańcuch przed działaniem destrukcyjnych enzymów oraz jest rozpoznawana przez białko eIF4E inicjujące syntezę białek w cytoplazmie (Kuhn *et al.*, 2010; Jemielity *et al.*, 2010; Ziemniak *et al.*, 2013; Stepinski and Darzynkiwicz 2014).

Aby leczenie przy pomocy syntetyzowanego przez nas IVT mRNA miało jak największe szanse powodzenia, planujemy przygotowanie transkryptów, które jednocześnie będą zawierały wybrane analogi kapu zapewniające wysoką wydajność translacyjną i odporność na degradację oraz dodatkowe elementy strukturalne gwarantujące identyfikację wprowadzonego do komórki mRNA, jako własne.

Komórki ssacze zawierają sensory RNA układu immunologicznego, które muszą być brane pod uwagę przy syntezie terapeutyków. Brak modyfikacji występujących naturalnie w transkryptach prowadzi do stymulacji układu odpornościowego i indukuje wydzielanie interferonu. Ostatnie doniesienia wskazują na istotną rolę metylacji drugiego nukleotydu (tzw. kap1) dla rozpoznania cząsteczki mRNA (Kumar *et al.*, 2014; Habjan *et al.*, 2013; Zust *et al.*, 2011). Transkrypty posiadające podstawowy monometylowany kap (kap0), typowy dla niższych eukariontów, wywołują odpowiedź układu immunologicznego analogiczną jak w przypadku infekcji wirusowej. Jednym z wielu białek, którego produkcja jest indukowana w odpowiedzi układu immunologicznego na rozpoznanie kap0-RNA jest IFIT1 (interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats) białko mające zdolność wiązania kap0-mRNA i inhibicji biosyntezy kodowanego przez nie białka. Do tej pory zostały jedynie wyznaczone pozorne stałe dysocjacji białka IFIT1 do 5'pppRNA i cap0-RNA przy użyciu techniki inhibicji wydłużania starterów. Nie wiadomo jak wpływają białka IFIT2 i IFIT3 tworzące kompleks z IFIT1 na wiązanie 5' końca mRNA. Dokładne zbadanie interakcji między białkiem IFIT1 a analogami kapów pozwoli na poznanie wpływu modyfikacji obecnych na 5' końcu mRNA na wydajność translacji a tym samym efektywniejsze wykorzystanie potencjału terapeutycznego cząsteczki mRNA.

Proponowany projekt ma na celu badania oddziaływania białka IFIT1 z różnymi di-, tri- i tetra- nukleotydowymi analogami kapu posiadającymi natywnie występujące modyfikacje na 5' końcu mRNA. Zadaniem doktoranta będzie przygotowanie obiektów badawczych, czyli sklonowanie białek IFIT do wektorów ekspresyjnych, ich nadekspresja i oczyszczenie przy pomocy chromatografii powinowactwa i jonowymiennej. Doktorant wykona przy użyciu technik biofizycznych takich jak kalorymetria, interferometria czy spektroskopia fluorescencyjna dokładne pomiary biomolekularnych oddziaływań białka IFIT1 z serią analogów kapu. Przy pomocy technik modelowania molekularnego

postara się określić sposoby wiązania analogów kapu do białka IFIT1. Wśród badanych ligandów znajdują się GpppG, m7GpppG, m7GpppNm (kap1), m7GpppNmNm (kap2). Badania przy użyciu izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego pozwolą na wyznaczenie równowagowej stałej asocjacji K_{as} . Jest to jedyna technika pozwalająca bezpośrednio wyznaczyć parametry termodynamiczne (ΔH - entalpia) umożliwiającą wgląd w fizyczny charakter oddziaływań, poznanie selektywności w wiązaniu różnych ligandów. Pomiar zostanie potwierdzony przy użyciu interferometrii, która dodatkowo pozwala na wgląd w kinetykę procesów asocjacji i dysocjacji w warunkach nierównowagowych. Białko IFIT1 tworzy kompleksy z partnerami IFIT2 i IFIT3. Planowane są badania mające na celu ocenę wpływu białek IFIT2 i IFIT3 na wiązanie ligandów przez IFIT1 przy użyciu tej samej metodologii, co opisano powyżej.

Proponowany projekt będzie miał również wymiar aplikacyjny. Doktorant opracuje test pozwalający na szybką ocenę tolerancji nowo syntetyzowanych analogów kapu przez białko IFIT1. Analogi kapu wykazujące najlepsze parametry zostaną wbudowane do mRNA i przetestowane w komórkach eukariotycznych HEK293T. Istotnymi parametrami które doktorant będzie miał za zadanie monitorować będzie efektywność translacji reporterowego białka lucyferazy oraz stabilność kapowanego mRNA.

Tematyka badań zakłada połączenie elementów biofizyki, modelowania i symulacji komputerowych, biologii molekularnej i komórkowej i będzie realizowana w dużym interdyscyplinarnym zespole. Wyposażenie aparaturowe i opracowane techniki badawcze zespołów Laboratorium Ekspresji Genów kierowanego przez prof. E. Darżynkiewicza i Laboratorium Maszyn Biomolekularnych dr hab. J. Trylskiej w pełni gwarantują możliwość realizacji projektu badawczego. Dysponujemy zapleczem aparaturowym umożliwiającym stosowanie technik klonowania DNA do wektorów plazmidowych i ich modyfikacji (m.in. termocyklery, aparaty do elektroforezy w żelach agarozowych, stanowisko pracy sterylnej przy komorze laminarnej) nadekspresji białek (cieplarki i wytrząsarki mikrobiologiczne, kolumny ze złożami stosowanymi do oczyszczania: jonowymienne, powinowactwa, systemy FPLC), systemy do elektroforezy w żelach poliakrylamidowych, otrzymywania pełnych transkryptów mRNA i krótkich oligorybonukleotydów. W laboratorium opracowano szereg procedur uzyskiwania białek enzymatycznych i czynników translacyjnych. Dysponujemy pracownią hodowli komórek eukariotycznych.

Laboratorium Maszyn Biomolekularnych kierowane przez współprowadzącego opiekuna pracy doktorskiej używa metod modelowania molekularnego, symulacji komputerowych i bioinformatyki oraz biofizyki doświadczalnej. Do określenia własności fizykochemicznych i dynamiki wewnętrznej badanych układów na poziomie atomowym wykorzystuje symulacje dynamiki molekularnej. Równolegle, do wyznaczenia parametrów termodynamicznych oraz kinetyki reakcji, stosuje metody spektroskopii absorpcyjnej, fluorescencyjnej i dichroizmu kołowego oraz techniki mikrokalorymetryczne.

Doktorant będzie wykonywał zarówno badania biochemiczne jak i biologiczne w grupie prof. Darżynkiewicza, a także badania termodynamiki oddziaływania białka IFIT1 z analogami kapu oraz przewidywania strukturalne i symulacje dynamiki molekularnej w grupie dr hab. Joanny Trylskiej. Będzie musiał się nauczyć zarówno technik doświadczalnych jak i modelowania i symulacji dynamiki badanych układów.

Literatura:

Habjan M., Hubel P., Lacerda L., Benda C., Holze C., Eberl CH., Mann A., Kindler E., Gil-Cruz C., Ziebuhr J., Thiel V., Pichlmair A. Sequestration by IFIT1 impairs translation of 2'O-unmethylated capped RNA. *PLoS Pathog* 2013; 9(10):1-14

Jemielity J., Kowalska J., Rydzik AM., Darzynkiwicz E. Synthetis mRNA cap analogs with a modified triphosphate bridge – synthesis, applications and prospects. *New J Chem* 2010, 34:829-844

Kuhn A.N., Diken M., Kreiter S., Selmi A., Kowalska J., Jemielity J., Darzynkiewicz E., Huber C., Tureci O., Sahin U. Phosphorothioate cap analogs increase stability and translational efficiency of RNA vaccines in immature dendritic cells and induce superior immune responses in vivo, *Gene Therapy* 2010; 17, 961-971

Kumar P., Sweeney TR., Skabkin MA., Skabkina OV., Hellen CUT., Pestova TV. Inhibition of translation by IFIT family members is determined by their ability to interact selectively with the 5'-terminal regions of cap0-, cap1- and 5'ppp- mRNAs. *Nucleic Acid Res* 2014; 42(5):3228-45

Sahin U., Kariko K., Tureci O. mRNA-based therapeutics – developing a new class of drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2014 Oct;13(10):759-80

Stepinski J and Darzynkiewicz E. mRNA and snRNA cap analogs: synthesis and applications. *Chemical Biology of Nucleic acids.* 2014; 511-561

Vallazza B., Petri S., Poleganov MA., Eberle F., Kuhn AN., Sahin U. Recombinant Messenger RNA technology and its application in cancer immunotherapy, transcript replacement therapies pluripotent stem cel induction, and beyond. *WIREs RNA* 2015

Ziemniak M., Strenkowska M., Kowalska J., Jemielity J., Potential therapeutic application of RNA cap analogs. *Future Med. Chem* 5:1141-1172

Zust R., Cervantes-Barragan L., Habjan M., Maier R., Neuman BW., Ziebuhr J., Szretter KJ., Baker SC., Barchet W., Diamond MS., Siddell SG., Ludwig B., Thiel V. Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5. *Nature Immunol* 2011. Feb;12(2):137-43